

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-123195
(43)Date of publication of application : 21.05.1993

(51)Int.CI.

C12Q 1/68

(21)Application number : 03-285221
(22)Date of filing : 30.10.1991

(71)Applicant : HITACHI LTD
(72)Inventor : NAGAI KEIICHI
KANBARA HIDEKI

(54) METHOD FOR CARRYING OUT HOMOGENEOUS ASSAY OF NUCLEIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To accurately and simply determine an acid amount of a nucleic acid in high sensitivity in a solid phase as well as a liquid phase by a specific method using a single-stranded polynucleotide labeled with an energy donor and energy acceptor as a probe.

CONSTITUTION: A single-stranded polynucleotide having a polynucleotide each extending from the intermediate part and both end parts of the intermediate part to the both sides and labeling a nucleotide in the vicinity of the both end parts of the intermediate parts with such energy donor and energy acceptor capable of transferring energy between the both ends is prepared. Then the single-stranded polynucleotide is subjected to hybridization to DNA or RNA of a sample. It is successively detected that fluorescent emission in energy donor or energy acceptor by energy transfer generated when the energy donor is excited varies according to whether or not a hybrid of target DNA or RNA and the single-strand polynucleotide is formed.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 30.05.1997
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number] 3085756
[Date of registration] 07.07.2000
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

特開平5-123195

(43)公開日 平成5年(1993)5月21日

(51) Int. Cl.

C12Q I/68

識別記号

A 8114-4B

F I

審査請求 未請求 請求項の数8 (全8頁)

(21)出願番号

特願平3-285221

(22)出願日

平成3年(1991)10月30日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 永井 啓一

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 神原 秀記

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔

(54)【発明の名称】核酸のホモジニアス検定法

(57)【要約】

【目的】 核酸量を固相のみならず液相においても正確かつ簡便に定量する方法の提供。

【構成】 中間部分、及びその両端部より構成されるヌクレオチド鎖の両端部に含まれるヌクレオチドを、それぞれ相互にエネルギー移動を生ずるエネルギー供与体とエネルギー受容体で標識したプローブを調製し、このプローブを試料のDNA等とハイブリダイゼーション処理を行い、エネルギー供与体を励起したときに生ずるエネルギー移動による供与体又は受容体における蛍光発光の標的DNA等とのハイブリッド形成の有無による変化を検出することを特徴とする核酸の定量方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 中間部分、及び、その中間部分の両端部からそれぞれ両側に伸びるポリヌクレオチドを有し、該中間部分の両端部の近傍のヌクレオチドを、それぞれ、その間でエネルギー移動が生ずるようなエネルギー供与体及びエネルギー受容体で標識した一本鎖ポリヌクレオチドを調製し、該一本鎖ポリヌクレオチドを試料のDNA又はRNAにハイブリダイゼーションさせる処理を行い、該エネルギー供与体を励起したときに生ずる、エネルギー移動によるエネルギー供与体又はエネルギー受容体における蛍光発光の、標的DNA又はRNAとのハイブリッド形成の有無による変化を検出することにより、該試料中の標的DNA又はRNAの定量を行う方法。

【請求項2】 請求項1記載の方法において、中間部分のポリヌクレオチドの塩基配列が標的DNA又はRNAの塩基配列と相補性がなく、中間部分の両端部からそれぞれ両側に伸びるポリヌクレオチドの塩基配列が、標的DNA又はRNAの近接する塩基配列とそれ相補性を有することを特徴とする方法。

【請求項3】 請求項2記載の方法において、中間部分のポリヌクレオチドが20個以上の塩基からなり、中間部分の両端部からそれぞれ両端に伸びるポリヌクレオチドが10個以上の塩基からなることを特徴とする方法。

【請求項4】 請求項2又は請求項3記載の方法において、ハイブリッド形成時に生じる該受容体からの発光量の増加分を計測することにより、該試料中の標的DNA又はRNAの定量を行う方法。

【請求項5】 請求項1記載の方法において、中間部分のヌクレオチドの塩基配列が標的DNA又はRNAの塩基配列と相補性を有し、中間部分の両端部からそれぞれ両側に伸びるポリヌクレオチドの塩基配列が相互に相補性を有することを特徴とする方法。

【請求項6】 請求項5記載の方法において、中間部分のポリヌクレオチドが20個以上の塩基からなり、中間部分の両端部からそれぞれ両側に伸びるヌクレオチドが6～20個の塩基からなることを特徴とする方法。

【請求項7】 請求項5又は請求項6記載の方法において、ハイブリッド形成時に生じる該受容体からの発光量の減少分を計測することにより、該試料中の標的DNA又はRNAの定量を行う方法。

【請求項8】 請求項5又は請求項6の方法において、ハイブリッド形成時に生ずる該供与体からの発光量の増加分を計測することにより、標的DNA又はRNAの定量を行う方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、核酸の検定法、より詳しくは標的となるDNA又はRNA（以下「標的DNA等」と略記する）などの遺伝物質をこれと相補的な配列を持つポリヌクレオチドであるDNAプローブとのハイ

ブリッド形成により検定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 標的となるDNA等の試料の検定をこれと相補的な配列を持つDNAプローブとのハイブリッド形成により行う方法は、従来、プロシーディングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ユー エス エー 80巻 (1983年) 第278頁から282頁 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80 (1983) pp. 278-282) に記載されているように、フィルターなどの固相上でハイブリダイゼーション反応を行なうインホモジニアス法が中心であった。この方法では核酸試料の固相上への固定、未反応プローブの洗浄などの操作が必要なこと、及びハイブリダイゼーション反応に長時間を要するなどの問題点があった。

【0003】 そこで、(1) 液中でのハイブリダイゼーション反応を可能とする、ホモジニアスな手法が開発された。かかる手法は、特開昭58-23795に記載されている。この方法は、化学発光触媒と蛍光体を別々のDNAオリゴマーのそれぞれ3'端と5'端に標識しておき、標的DNAへのハイブリダイゼーションにより両者を隣接せしめて、エネルギー受容体である蛍光体からの化学発光条件下での発光を検出することにより標的DNAの有無を判定している。

【0004】 さらに、(2) 蛍光体間のエネルギー移動による、エネルギー供与側の蛍光体の消光の程度を検出することによる、液中でのDNAハイブリッド体の検出法が特開昭62-244399に記載されている。この方法では、二本鎖を形成するDNAオリゴマーのそれぞれの3'端と5'端にエネルギー移動を起こす2種の蛍光体を標識しておき、標的DNAとのハイブリッド形成による二本鎖オリゴマーの解離に基づくエネルギー移動の解消による、エネルギー供与体からの発光の回復を計測することでハイブリッド形成を判定している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 上記(1)の化学発光触媒と蛍光体を標識する方法では、(a) 標的DNAの検出に2種類のDNAオリゴマーを用いるため、検出に関わる反応が3分子反応であり、ハイブリダイゼーション反応に要する時間が長くなるという欠点がある。また、(b) 標的DNAとその相補鎖との再結合反応の影響を受け易いという欠点も生ずる。さらに(c)ハイブリダイゼーション反応の時間の短縮とハイブリダイゼーションの効率を上げるために標識オリゴマーの濃度を増加させると雑音となるバックグラウンドの発光が増えてしまうという問題がある。このため従来、標的DNA検出の高感度化にはおのずから限界があった。

【0006】 また、上記(2)の二本鎖DNAオリゴマーと標的二本鎖DNA間の再結合反応を利用する方法では、競合反応を利用するため標的DNAに対する標識DNAオリゴマーのハイブリダイゼーション効率を上げる

ことに問題があり、やはり標的DNA検出高感度化には限界があった。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、エネルギー供与体とエネルギー受容体とを標識した一本鎖ポリヌクレオチドをプローブとして用いることでこの課題を解決しうることを見出した。すなわち、本発明は中間部分、及び、その中間部分の両端部からそれぞれ両側に伸びるポリヌクレオチドを有し、該中間部分の両端部の近傍のヌクレオチドを、それぞれ、その間でエネルギー移動が生ずるようなエネルギー供与体及びエネルギー受容体で標識した一本鎖ポリヌクレオチドを調製し、該一本鎖ポリヌクレオチドを試料のDNA又はRNAにハイブリダイゼーションさせる処理を行い、該エネルギー供与体を励起したときに生ずる、エネルギー移動によるエネルギー供与体又はエネルギー受容体における蛍光発光の、標的DNA又はRNAとのハイブリッド形成の有無による変化を検出すことにより、該試料中の標的DNA又はRNAの定量を行う方法を提供するものである。

【0008】本発明においては、中間部分及びその中間部分の両端部からそれぞれ両側に伸びるポリヌクレオチドを有し、該中間部分の両端部の近傍のヌクレオチドを、それぞれその間でエネルギー移動を生ずるようなエネルギー供与体及びエネルギー受容体で標識した一本鎖ポリヌクレオチド鎖をプローブとすることが必要である。

【0009】プローブの基となる一本鎖ポリヌクレオチドの具体的な塩基配列は、標的DNA等の塩基配列及び本発明の実施態様に応じて決定される。すなわち、一本鎖ヌクレオチドを標識しているエネルギー供与体とエネルギー受容体との距離を、標的DNA等とのハイブリッド未形成時において、エネルギー供与体とエネルギー受容体の間で、エネルギーの移動が生ずるべくプローブを設計するか否かにより相違する。

【0010】すなわち、(1) ハイブリッド未形成時にエネルギー移動が生ずるべくプローブを設計する場合には、ハイブリッド形成時には、エネルギー移動を生じない程十分に、エネルギー供与体とエネルギー受容体が離れるように設計することが必要である。具体的には、中間部分のポリヌクレオチドの塩基配列が標的DNA等の塩基配列と相補性を有し、かつ、中間部分の両端部からそれぞれ両側に伸びるポリヌクレオチドの塩基配列が相互に相補性を有するべくプローブの塩基配列を設計するのが好ましい。

【0011】かかる場合、中間部のポリヌクレオチドに含まれる塩基は、一般的には、少なくとも10個以上、好ましくは20個以上となるように設計し、この中間部分の両端部からそれぞれ両側に伸びるポリヌクレオチドに含まれる塩基は6個以上、より好ましくは6~20個になる

10

20

30

40

50

よう設計することで、後述するステップを経て本発明の目的を達成し得る。

【0012】なお、上記において「相補性を有する」とは、所要のハイブリダイズが可能な程度に互いに相補的であることを意味するもので、完全に互いの塩基が相補的である場合はもちろん、ポイントミューテーション、数塩基程度の挿入・欠失により、非相補的な塩基が含まれている場合も含まれる。

(2) ハイブリッド未形成時には、エネルギー移動を生じないようにプローブを設計する場合には、ハイブリッド形成時には、エネルギー移動を生ずるのに十分にエネルギー受容体とエネルギー供与体とが接近するように設計することが必要である。

【0013】具体的には、中間部分のポリヌクレオチドの塩基配列が標的DNA等の塩基配列と相補性がなく、中間部分の両端部から、それぞれ両側に伸びるポリヌクレオチドの塩基配列が、標的DNA等の近接する塩基配列とそれぞれ相補性を有するべく、プローブの塩基配列を設計するのが好ましい。かかる場合、中間部のヌクレオチド鎖に含まれる塩基は、一般的には、少なくとも10個以上、好ましくは20個以上となるように設計し、この中間部分の両端部から、それぞれ両側に伸びるポリヌクレオチドに含まれる塩基は8個以上、好ましくは20個以上となるように；さらに標的DNA等とハイブリッドさせた場合にプローブの中間部分の両端部からそれぞれ両側に伸びるポリヌクレオチド同士が少なくとも10塩基、好ましくは4塩基以下になるように設計することで、後述するステップを経て本発明の目的を達成し得る。

【0014】なお、上記において「相補性がなく」とは完全に非相補的であるのが好ましいが、所要のハイブリダイズが生起しない程度に非相補的な場合も含まれる。このようにして設計されたプローブは、通常公知の方法に従い化学合成することにより得ることができる。(1)(2)のごとく設計し、得られたポリヌクレオチドの中間部分の両端部の近傍のヌクレオチドをそれぞれ相互にエネルギー移動を生ずるようなエネルギー供与体とエネルギー受容体とで標識することで、本発明の第一の構成要件であるプローブが完成する。

【0015】標識部位となるヌクレオチドは、中間部分の両端部の近傍に存在することが必須である。中間部分の両端部の近傍とは、プローブの中間部分の両端部のヌクレオチドから5'又は3'方向に向かって1個目のヌクレオチドから5'末端又は3'末端に位置するヌクレオチドに該当する部分全てを指すが、好ましくは、中間部の両末端から5塩基以内の部分を指すものである。

【0016】エネルギー供与体とエネルギー受容体の種類は、相互にエネルギーの励起移動が起り、かかる励起移動が測定可能な限りにおいて特に限定されない。エネルギー供与体及びエネルギー受容体間の無輻射的なエネルギー移動の効率については、フェルスター (Von Th.

Foerster)による式が知られている(アンナーレン デア フュジーク シリーズ6, 2巻(1948年) 第55頁から75頁(Annalen der Physik. 6. Folge. Band2. (1948) pp. 55-75) 参照)。これによれば、エネルギー移動速度は、エネルギー供与体とエネルギー受容体間との距離の6乗に反比例し、エネルギー供与体の発光スペクトルとエネルギー受容体の吸収スペクトルの重なりに比例する。また、エネルギー供与体とエネルギー受容体の配向によっても影響を受ける。

【0017】エネルギー移動のエネルギー供与体及びエネルギー受容体間の距離依存性の実験的研究がストライヤー(L. Stryer)とホーグランド(R.P. Haugland)によって報告されている(プロシードィングス オブ ザ ナショナル アカデミー オブサイエンシズ オブ ユニエス エー 58巻(1967年) 第719頁から726頁(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 58 (1967) pp. 719-726) 参照)これは、ポリペプチドオリゴマーのペプチドの個数を変えることにより、その両端にあるエネルギー供与体とエネルギー受容体の距離を変化させたもので、エネルギー移動の距離依存性がフェルスターの式とよく一致していることを示している。またエネルギー移動の効率として、エネルギー供与体及びエネルギー受容体間の距離 1.2 nm のとき 100%、4.6 nm のときの 16% という値を得ている。

【0018】したがって、一本鎖DNAオリゴマーに標識されたエネルギー供与体とエネルギー受容体の距離が、一本鎖DNAオリゴマー単独のときと標的となるDNAあるいはRNAとハイブリダイゼーションしているときで大きく違えば、エネルギー供与体を光で励起したときのエネルギー供与体又はエネルギー受容体からの発光量は変化するのでこの変化量を計測することにより、標的DNA又はRNAとハイブリダイゼーションしているDNAオリゴマー量を定量することができる。すなわち、標的DNA量又はRNA量を定量することができる。

【0019】エネルギー供与体としては、例えば、フルオロセイン、フルオレセインイソチオシアネイト等のフルオレセイン系の色素等を; エネルギー受容体としては、例えば、テトラメチルローダミンイソチオシアネイト(TRITC)等のローダミン系の色素及びアルミニウムフタロシアニン等のフタロシアニン系の色素等を例示することができる。なお、エネルギー供与体としてはアルゴンイオンレーザー(発振波長488nm)で効率よく励起できるフルオレセインイソチオシアネイト(FITC)が好ましく、これに対応する受容体としては、励起スペクトルがFITCの蛍光スペクトルと重なりが大きく、かつ蛍光スペクトルの極大がFITCのそれと 100nm近く離れているスルフォローダミン101の塩化スルフォン酸誘導体(商品名 テキサスレッド)を用いるのが好ましい。

【0020】エネルギー供与体とエネルギー受容体とのプローブへの標識方法は、標識する物質により異なるが、一般的には、特開昭61-44353に開示された方法に従うのが好適である。この方法は、ポリヌクレオチドの蛍光体標識部位のリン酸結合を官能基を有するホスホン酸結合に置き換え、この官能基と蛍光体結合させることにより蛍光体標識を表現するものであり、任意の位置に標識物を導入できる手法である。

【0021】エネルギー供与体及びエネルギー受容体をそれぞれ1分子ずつ標識する場合には、例えばホスホン酸を予め導入したポリヌクレオチドにエネルギー供与体又はエネルギー受容体の一方を標識し(特開昭61-44353号公報)、反応生成物を液体クロマトグラフィー等で随時モニターし、この際DNA由来の260nm付近の吸光度とエネルギー供与体又はエネルギー受容体に特異的な吸光度とを比較し、エネルギー供与体又はエネルギー受容体がある程度導入はされているが、2個以上導入されているポリヌクレオチドがそれほど多くないと判断可能な段階で反応を停止させ、反応生成物を電気泳動法等を用いて分離し、エネルギー供与体又はエネルギー受容体が1分子導入されたポリヌクレオチドのみを単離後、他方のエネルギー供与体又はエネルギー受容体を同様の方法を用いて標識する方法を用いることができる。

【0022】さらに、エネルギー供与体又はエネルギー受容体の標識位置を、中間部の両端部の近傍の互いに異なる塩基配列に対応させて確定する場合には、予め、それぞれの標識物に対応すべきプローブの5'側又は3'側に相当するポリヌクレオチドを別々に調製し、それぞれのポリヌクレオチドの所望の位置にエネルギー供与体又はエネルギー受容体を標識させた後で両者を連結させる方法を用いることができる。かかる場合それぞれのポリヌクレオチドに含まれる塩基数は通常6~50塩基であり、10~20塩基であることが好ましい。そしてこの2つの標識ポリヌクレオチドを通常公知の方法で連結させ、所望のエネルギー供与体とエネルギー受容体の標識位置が確定したプローブを調製することができる。

【0023】なお、標識するエネルギー供与体及びエネルギー受容体は、通常それぞれ1ヶ所に標識すれば足りるが、必要な場合は、同一の近傍部分内であれば複数ヶ所に標識することもできる。さらに、エネルギー供与体及びエネルギー受容体の標識方法は上記に限定されるものではなく、例えば上記のヌクレオチド骨格のリン原子への標識方法以外に、塩基に直接標識する手段(サイエンス 238巻(1987年) 336~341頁)をも好適な標識方法として選択することができる。

【0024】次に、前記より得られた標識プローブと標識DNA等をハイブリダイズすることが必要である。このハイブリダイズの方法として、従来より広く用いられているザザンプロットフィルターハイブリダイゼーション法(Southern, E., J. Mol. Biol., 98, 503, 1975)等

の固相法を採用することができるのももちろんあるが、従来は、自動化には好適であるが、従来標的DNA等の検出の感度に問題があるとされた液相法をも用いることができる。

【0025】この液相ハイブリダイゼーションはハイブリダイズさせるDNA同士を、一価の陽イオンの存在下で適当な温度条件を設定することによって、簡便・正確に行うことができる。液相として用いる緩衝液は、ハイブリダイズを阻害しない範囲で広く用いることができる。例えば、リン酸緩衝液やトリス塩酸緩衝液をpH8付近に調整して用いることができる。一価の陽イオンとしても特に限定されず、例えばナトリウムイオンを好みるものとして用いることができる。

【0026】ハイブリダイズの反応自体は、DNA分子自らの折りたたみ等を解消し、ハイブリダイズし易くするための昇温過程と、ハイブリダイズを行う降温過程を通して行われる。昇温過程は60~95℃、好ましくは65℃付近まで液相温度を上昇させることにより行われ、降温過程は一旦昇温させた液相を37℃~室温、好ましくは25℃付近まで下降させることによって行われる。一般にこの降温過程に要する時間は、少なくとも5分以上は必要であるが、15分間あれば十分にハイブリダイズは終了する。

【0027】さらに、ハイブリダイズ前後の標識されたエネルギー供与体あるいは受容体における励起による蛍光発光の変化を検出して、試料中の標的DNA等の定量を行なう必要がある。ハイブリッド未形成時に、エネルギー供与体と受容体間にエネルギー移動が生ずるようになつハイブリッド形成時には、エネルギー移動が生じないようにプローブを設計した場合には、ハイブリッド形成時に生ずる受容体からの発光量の減少分を計測することにより、又は、供与体からの発光量の増加分を計測することにより、標的DNA等の定量を行ない得る。

【0028】逆にハイブリッド未形成時にエネルギー移動を生じないように、かつハイブリッド形成時にエネルギー移動を生ずるようにプローブを設計した場合には、ハイブリッド形成時に生ずる受容体からの発光量の増加分又は供与体からの発光量の減少分を計測することにより、標的DNA等の定量を行ない得る。エネルギー供与体又は受容体の励起は、少なくとも供与体を特異的に励起することができる特性を有する光を照射することにより行なわれる。

【0029】例えば、エネルギー供与体としてFITCを、エネルギー受容体としてテキサスレッドを用いた場合には、FITCを効率良く励起することができる発振波長488nmのアルゴンレーザー等を用いてFITCを励起するのが好ましい。試料中の標的DNA等の量に対応する蛍光量の増減は、目視法によって測定することもできるが、簡便性・正確性を期するうえでハイブリダイズから蛍光量測定までの一連の操作を専用の測定機器を用

10

20

30

40

50

いて測定するのが好ましい。

【0030】かかる測定機器は例えば図1に示した構成による。図1において、1は試料を封入する試料管である。2は光源である。光源の種類は、標識されたエネルギー供与体及び受容体の種類に応じて選択される。3、4は干渉フィルターである。このフィルターの半値幅は20~30nm程度が好ましい。5、6は光電子増幅装置である。7~11はレンズである。

【0031】なお、試料から発する蛍光の強度は、光線の照射方向とほぼ直角をなす方向で測定するのが好ましい。標的DNA等の定量は、濃度既知の標準試料を使用して検量線を作成して行なうことができる。標的となるDNA等については、特に限定ではなく、ファージ、ウイルス、細菌を始めとするヒトその他の高等生物のゲノムDNA等を対象とすることができる。

【0032】

【発明の効果】本発明によれば、自動化に好適な液中のハイブリダイゼーション反応を実現できるホモジニアスなDNAの検定法の高感度化が実現できる。すなわち、標識DNAオリゴマーと標的DNAとの近似的な2分子反応によりハイブリダイゼーション反応を実現できるため、ハイブリダイゼーションの効率を高くすることができる。また、単一のDNAオリゴマーを用いた標的DNAとの競合反応を行うため、DNAオリゴマー内の二本鎖形成部分と標的DNAとのハイブリダイゼーション部分の塩基長を別々に選定できる。このため、DNAオリゴマー内の二本鎖再形成を抑え標的DNAとのハイブリダイゼーションの効率を高くすることができる。

【0033】

【実施例】以下、実施例を挙げて、本発明について具体的に説明する。

【0034】

【実施例1】 本実施例はハイブリッド未形成時にエネルギー移動を生じないように、かつハイブリッド形成時にエネルギー移動を生ずるべく設計したプローブについての一実施態様である。本実施例の概略を図2に示す。本実施例においては、標的DNA試料17として、M13ファージのDNA(二本鎖のM13mp8RF DNA)を用いた。

【0035】(1) プローブとして用いるDNAオリゴマーの調製

本実施例においてプローブとして用いる二本鎖DNAオリゴマーを以下の様に設計した。図2において、一本鎖DNAオリゴマー12の端部13の塩基配列としてM13ファージのDNAシーケンス用のプライマーと同一の配列番号1で示される15塩基配列及びこれに隣接する配列番号2で示される15塩基配列を；中間部分14として標的DNAの塩基配列と相關のない配列番号3で示された30塩基配列を選択し、計60塩基からなるDNAオリゴマー12を設計した。

【0036】この60塩基からなるDNAオリゴマー12の

うち30塩基分ずつを、以下の標識過程に付する目的で市販のDNAシンセサイザより合成した。

(2) DNAオリゴマーの標識

エネルギー供与体15としてフルオロセインイソチアネイト(FITC)(同社製)を、エネルギー受容体16としてスルフォローダミン101の塩化スルfonyl酸誘導体(商品名テキサスレッド:モレキュラープローブ社製)を選択して上記(1)で得られた一本鎖DNAオリゴマーを以下の手順で標識してプローブを調製した。

【0037】この標識には、ポリヌクレオチドの蛍光体標識部位のリン酸結合を官能基を有するホスホン酸結合に置き換え、この官能基と蛍光体を蛍光体結合させる蛍光体標識法である特開昭61-44535号公報に開示してある方法を用いた。端部2における標識位置は、5'末端から3'方向に13番目のグアニン(G)と14番目のシトシン(C)の間のリン酸部分と、3'末端側から5'方向に13番目のチミン(T)と14番目のグアニン(G)の間のリン酸部分とした。すなわち、DNA試料6とハイブリダイゼーションさせると標識物同士が3塩基分離れて位置するよう標識部位を設定した。

【0038】これらのリン酸結合の部分を、特開昭61-44535号公報に開示された方法に従い、前記の2つの30塩基からなるオリゴヌクレオチドを別々に、エネルギー供与体15であるFITCとエネルギー受容体16であるテキサスレッドで標識した。この別々の蛍光色素15、16で標識したオリゴヌクレオチドをそれぞれの連結部の両側の10塩基に対して相補的な塩基配列を有する20塩基のオリゴヌクレオチドをDNAシンセサイザで合成し、この20塩基のオリゴヌクレオチドと蛍光体が標識された2種類の30塩基のオリゴヌクレオチドとを前記したハイブリダイゼーション条件下(100mM Na⁺イオンの存在下で65℃まで昇温後、10分間で25℃まで降温)で、ハイブリダイズ後、T4DNAリガーゼを用いて、本実施例で使用する標識プローブ12と上記20塩基のオリゴヌクレオチドの複合体を得た。

【0039】このDNA複合体を、通常公知の方法によりホルムアミドで一本鎖DNAに変性して、ゲル電気泳動により分子量分離して、本実施例で使用する標識プローブ12を得た。

(3) 標的DNA量の測定

次に上記(2)により得られた標識プローブ12を用いて標的DNA17の量を測定した。

【0040】この測定には図1に示した構成の測定機器を用いた。試料管1として、キャピラリーセルを、光源2として出力10mWの空冷アルゴンレーザー(発振波長488nm)を、3及び4の干渉フィルターとして、それぞれ515nm及び610nmをピークとする半値幅25nmの干渉フィルターを用いた。又、試料19から発する蛍光の強度は、アルゴンレーザー2の照射方向とほぼ直角をなす方向で測定した。

【0041】標識プローブ12と標的DNA試料17を微量のサンプルの測定が可能なキャピラリーセル1に、pH8に調整した100mMのNa⁺イオンを含有するリン酸緩衝液、標的試料17及び標識プローブ12を封入した(図2、18)。先ず、アルゴンレーザー2をキャピラリーセル1に照射し、この時のFITCに由来する515nm近傍の蛍光量とテキサスレッドに由来する610nm近傍の蛍光量を測定した。

【0042】次にキャピラリーセル1の温度を65℃まで上昇させた後、10分間かけて25℃まで冷却した。25℃まで冷却した際の、アルゴンレーザー2の照射による515nm近傍と610nm近傍の蛍光量を測定した。この結果、標的DNA試料17であるM13nm8RF DNAの添加量に対して用量依存的に、エネルギー受容体として選択したテキサスレッド16に由来する610nm近傍の蛍光量が増加した。

【0043】これにより、標識プローブ12と標的DNA試料17が複合体19を形成して、エネルギー供与体15とエネルギー受容体16の間のエネルギー移動を惹起することにより、定量的に標的試料17の存在量が測定可能であることが判明した。

【0044】

【実施例2】 本実施例は、ハイブリッド未形成時にエネルギー移動を生ずるように、かつハイブリッド形成時にエネルギー移動を生じないように設計したプローブについての一実施態様である。本実施例の概略を図3に示す。用いた標的DNA試料25は、実施例1と同様にしてM13ファージのDNA(二本鎖のM13nm8RF DNA)を用いた。

【0045】(1) プローブとして用いるDNAオリゴマーの調製

本実施例において用いる一本鎖DNAオリゴマーを以下の様に設計した。図3において、一本鎖DNAオリゴマー20の両方の端部21として配列番号4で示される6塩基配列を；中間部分22として配列番号5で示される30塩基配列を選択し、計42塩基からなるDNAオリゴマーを設計した。

【0046】この中間部分22は、M13mp8クローニング用の部位及びそれに隣接する部位にハイブリダイゼーションする配列であり、端部21は互いに相補的であるので、このDNAオリゴマーを単独でハイブリダイゼーション条件下に置いた場合、互いにハイブリダイズして二本鎖を形成し得る。このプローブとして用いる一本鎖オリゴマー20は、実施例1と同様に、予め21塩基からなる2つのオリゴヌクレオチドを市販のDNAシンセサイザで合成し、エネルギー供与体23であるFITCとエネルギー受容体24であるテキサスレッドを下記(2)の方法により標識した標識プローブである。

【0047】(2) DNAオリゴマーの標識

実施例1と同様にして、エネルギー供与体23としてF I

TCを、エネルギー受容体24としてテキサスレッドを選択して上記(1)に示すそれぞれの21塩基の一本鎖オリゴマーを標識してこれらを連結して標識プローブ20を調製した。なお、標識位置は、一本鎖DNAオリゴマー20の5'端から3'方向に1番目のグアニン(G)と2番目のアデニン(A)の間のリン酸部分と、3'端から5'方向に5番目のアデニン(A)と6番目のグアニン(G)の間のリン酸部分とした。

【0048】(3) 標的DNA量の測定

先ず、調製した標識プローブ20を、キャピラリーセル1中で実施例1と同一の条件で、端部21同士をハイブリダイズさせた(図3、26)。この時点で、キャピラリーセル1にアルゴンレーザー2を照射して、エネルギー供与体23とエネルギー受容体24に由来する蛍光量を測定した。

【0049】次に、このキャピラリーセル1に標的DNA試料25を添加し、再び前記のハイブリダイゼーション反応を行ない、反応後のキャピラリーセルにアルゴンレーザー2を照射してエネルギー供与体23とエネルギー受容体24に由来する蛍光量を測定した。この結果、標的DNA試料25であるM13nm 8 RFDNAの添加量に対して用量依存的に、エネルギー受容体として選択したテキサスレッド24に由来する610nm近傍の蛍光量が減少した。

【0050】これにより、ハイブリダイズすることによって生ずる標識プローブ26におけるエネルギー供与体23からエネルギー受容体24へのエネルギー移動によるテキサスレッド24に由来する610nm近傍の蛍光量が、標的DNA試料25と標識プローブ26と中間部分22のハイブリダイズにより標識プローブ26における端部21同士の水素結合が切断されエネルギー供与体23とエネルギー受容体24の距離が離れて、相互間のエネルギー移動を生じなくなることにより(28)、定量的にDNA標識試料25の存在量が測定可能であることが判明した。

【0051】

【配列表】

配列番号 : 1
配列の長さ : 15
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

起源 : M13ファージ
配列 : T G T A A A A C G A C G G C C
配列番号 : 2
配列の長さ : 15
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA
起源 : M13ファージ
配列 : A G T G C C A A G C T T G G C
配列番号 : 3
配列の長さ : 30
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA
配列 : A C A T T T G C T G C C G G
T C A C G G T T C G A A C C G
配列番号 : 4
配列の長さ : 6
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA
起源 : M13ファージ
配列 : G A T A T C
配列番号 : 5
配列の長さ : 30
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 一本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : 他の核酸 合成DNA
起源 : M13ファージ
配列 : T G T A A A A C G A C G G C C A G T G
C C A A G C T T G G C

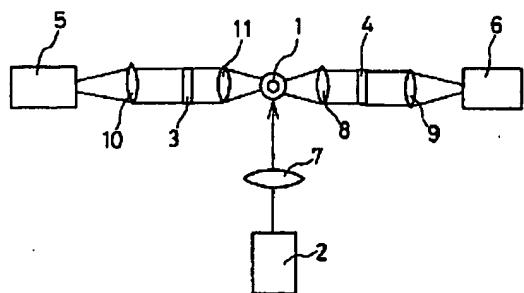
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施に供する測定機器の構成である。

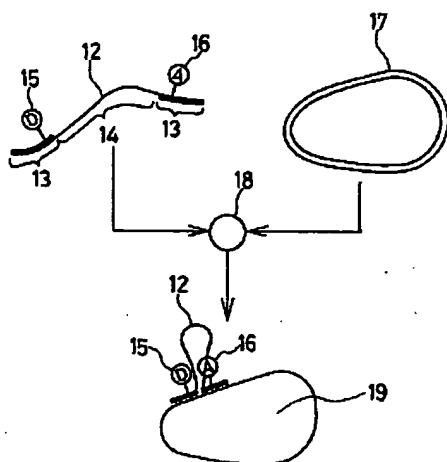
【図2】実施例1の概略図である。

【図3】実施例2の概略図である。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

